

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

|  |   |  |                                       |   |                |
|--|---|--|---------------------------------------|---|----------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Select All | <input type="checkbox"/> Clear Selections | <input type="checkbox"/> Print/Save Selected | <input type="checkbox"/> Send Results | <input type="checkbox"/> Display Selected | Format<br>Free |
|--|---|--|---------------------------------------|---|----------------|

1. ☐ 8/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013700921

WPI Acc No: 2001-185145/200119

XRAM Acc No: C01-055894

XRPX Acc No: N01-132188

Measuring saccharified amine for diagnosis and treatment of diabetes, comprises oxidative degradation of the amine by specific enzymes and determining amine concentration by comparing the measured values

Patent Assignee: KYOTO DAIICHI KAGAKU KK (KYOT-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No     | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|---------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| JP 2000333696 | A    | 20001205 | JP 99146685 | A    | 19990526 | 200119 B |

Priority Applications (No Type Date): JP 99146685 A 19990526

Patent Details:

| Patent No     | Kind | Lan | Pg | Main IPC    | Filing Notes |
|---------------|------|-----|----|-------------|--------------|
| JP 2000333696 | A    |     | 6  | C12Q-001/26 |              |

Abstract (Basic): JP 2000333696 A

NOVELTY - Measuring saccharified amine in a sample involving oxidative degradation of the saccharified amine by a saccharified amine oxidative degradation enzyme to form sugar and amine, is new.

DETAILED DESCRIPTION - Measuring saccharified amine in a sample involves oxidative degradation of the saccharified amine by a saccharified amine oxidative degradation enzyme to form sugar and amine. The saccharified amine is subjected to oxidative degradation by saccharide degradation enzyme. The consumption of sugar by both the methods is evaluated and the quantity of saccharified amine is determined by comparing the measured values.

USE - The method is used for measuring the blood glucose level to allow diagnosis and treatment of diabetes mellitus.

ADVANTAGE - The process is simple, highly precise and has high accuracy.

pp; 6 DwgNo 0/2

Title Terms: MEASURE; SACCHARIFICATION; AMINE; DIAGNOSE; TREAT; DIABETES; COMPRISE; OXIDATION; DEGRADE; AMINE; SPECIFIC; ENZYME; DETERMINE; AMINE; CONCENTRATE; COMPARE; MEASURE; VALUE

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/26

International Patent Class (Additional): C12Q-001/28; C12Q-001/54;

G01N-033/66; G01N-033/68; G01N-033/72

File Segment: CPI; EPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

|  |   |  |                                       |   |                |
|--|---|--|---------------------------------------|---|----------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Select All | <input type="checkbox"/> Clear Selections | <input type="checkbox"/> Print/Save Selected | <input type="checkbox"/> Send Results | <input type="checkbox"/> Display Selected | Format<br>Free |
|--|---|--|---------------------------------------|---|----------------|

© 2005 Dialog, a Thomson business

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-333696  
(P2000-333696A)

(43) 公開日 平成12年12月5日 (2000. 12. 5)

| (51) Int.Cl. | 識別記号  | F I     | キーワード (参考) |
|--------------|-------|---------|------------|
| C 1 2 Q      | 1/26  | C 1 2 Q | 2 G 0 4 5  |
|              | 1/28  |         | 4 B 0 6 3  |
|              | 1/54  |         |            |
| G 0 1 N      | 33/66 | G 0 1 N | C          |
|              | 33/68 |         |            |

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-146685

(22) 出願日 平成11年5月26日 (1999. 5. 26)

(71) 出願人 000141897

アークレイ株式会社

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 米原 聡

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(74) 代理人 100095555

弁理士 池内 寛幸 (外1名)

Fターム (参考) 2G045 AA13 AA25 CA02 CA25 DA17

DA30 DA35 DA44 DA45 DA48

FB01 GA06

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ16 QQ79

QQ80 QQ89 QR03 QR58 QR66

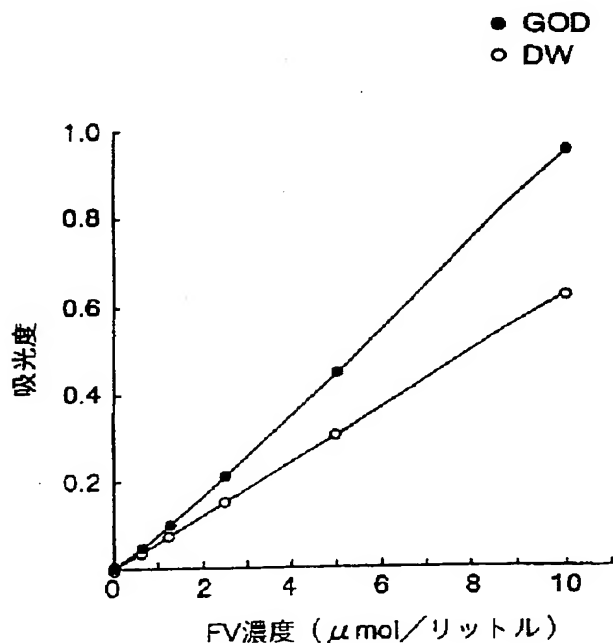
QS28 QX01

(54) 【発明の名称】 糖化アミンの測定方法

(57) 【要約】

【課題】 試料中の糖化アミンを、高精度で測定できる方法を提供する。

【解決手段】 糖化アミン酸分解酵素により、前記糖化アミンを糖とアミンとに酸分解し、糖酸分解酵素により、前記糖を酸分解し、前記両酸分解反応による同一生成物または同一消費物の量を測定し、この測定値から前記糖化アミンの量を決定する。例えば、糖化アミンが糖化タンパク質の場合、試料をプロテアーゼで分解した後、これをフルクトシルアミノ酸オキシダーゼで処理し、続いてグルコースオキシダーゼで処理する。そして、この溶液にペルオキシダーゼおよび発色性基質を添加して、その発色を測定すれば、図1に示すように、従来法よりも測定感度を向上することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の糖化アミンを測定する方法であって、糖化アミン酸化分解酵素により、前記糖化アミンを糖とアミンとに酸化分解し、糖酸化分解酵素により、前記糖を酸化分解し、前記両酸化分解反応による同一生成物または同一消費物の量を測定して、この測定値から前記糖化アミンの量を決定する測定方法。

【請求項2】 糖酸化分解酵素を反応溶液に、濃度1,000~5000,000U/リットルの範囲になるように添加する請求項1に記載の測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、試料中に存在する糖化タンパク質、糖化ペプチドまたは糖化アミノ酸等の糖化アミンの量を測定する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】血液中の糖化タンパク質、例えば、糖化アルブミンや、赤血球中の糖化ヘモグロビン（以下、「HbA1c」という）等は、生体内血糖値の過去の履歴を反映しているため、糖尿病の診断や治療等における重要な指標とされている。

【0003】このような糖化タンパク質の測定方法としては、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法、ミニカラム法、免疫法、酵素法などがあげられる。この中でも、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（FAOD）を用いた酵素法は、他の測定方法に比べ、正確かつ迅速に糖化タンパク質を測定できる方法である。

【0004】このFAODを用いた糖化タンパク質の測定方法は、例えば、FAODが作用し易いように糖化タンパク質をプロテアーゼで処理し、この分解物である糖化物にFAODを作用させ、前記FAODの触媒反応により生成する過酸化水素量を測定し、その測定値から糖化タンパク質の量及び糖化率を求める方法である。

【0005】しかし、前述の酵素法によると、低濃度の糖化タンパク質、特にHbA1cを測定することが困難であった。HbA1cの測定のためには、赤血球の溶血処理が必要であり、また、試薬の添加により試料は希釈されるため、HbA1cの濃度が検出限界に至ってしまい、測定が困難になる場合があった。さらに、前記従来法によるHbA1cの測定においては、例えば、試料間におけるHbA1cの濃度値が0.1%しか変化しない場合、生成される各々の過酸化水素量により前記濃度差を検出するには、その精度に問題があった。

【0006】これらの問題は、以下に示すような原因によると推測される。糖化タンパク質は、通常、N末端のα-アミノ基、ペプチド鎖中のリジン（Lys）側鎖基、アルギニン（Arg）側鎖基等に糖が付加しており、これらの糖化部分が前述のように測定される。特にHbA1cは、通常ヘモグロビン中に2個存在するβ鎖

のN末端バリン残基（α-アミノ基）が糖化されていることを特徴とするため、この糖化部分を測定することによりその量が求められる。実際にその量を数値で表すと、通常、健常者の血液には、分子量約65,000のヘモグロビン（Hb）が約130g/リットル（2mmol/リットル）含まれており、前記Hbのうち4%

（80μmol/リットル）がHbA1cであり、前記測定に関与する糖化部分を含むβ鎖の濃度は160μmol/リットルである。このβ鎖濃度が糖化部分（糖化されたα-アミノ基）の濃度に相当する。これを測定する際には、試料を100倍以上に希釈することが必要なため、非常に低濃度となる。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明の目的は、糖化アミンの量や糖化率の検出限界を従来法よりも低く設定でき、また、信頼性に優れる測定値を得ることができる糖化アミンの測定方法の提供である。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するために、本発明の測定方法は、試料中の糖化アミンを測定する方法であって、糖化アミン酸化分解酵素により、前記糖化アミンを糖とアミンとに酸化分解し、糖酸化分解酵素により、前記糖を酸化分解し、前記両酸化分解反応による同一生成物または同一消費物の量を測定して、この測定値から前記糖化アミンの量を決定することを特徴とする。

【0009】このように、糖化アミン酸化分解酵素および糖酸化分解酵素を併用すれば、1つの糖化部分に対し、2つの同一生成物が生成され、また2つの同一消費物が消費される。このため、本発明の測定方法は、従来法に比べ、理論上2倍の検出感度を実現でき、より正確に糖化アミンの測定を行うことができる。また、試料の希釈倍率を上げても、検出可能な前記生成物濃度または消費物濃度を保持することができるから、試料中の共存物質の影響を希釈により軽減できるという利点もある。

【0010】本発明の測定方法において、前記同一生成物は、過酸化水素であることが好ましい。また、前記同一消費物は、酸素であることが好ましい。

【0011】本発明の測定方法において、測定対象物の糖化アミンが、糖化アミノ酸、糖化タンパク質または糖化ペプチドであることが好ましい。また、糖化アミンが、糖化タンパク質または糖化ペプチドの場合は、予め前記糖化アミンをプロテアーゼで分解してから、その分解物と糖化アミン酸化分解酵素とを反応させることが好ましい。

【0012】試料には最初からグルコース等の糖酸化分解酵素の基質が存在する場合があるが、前記基質と前記糖酸化分解酵素との反応によって発生する過酸化水素や消費される酸素が測定精度に影響を与えるおそれがある。これを回避するために、本発明の測定方法におい

て、糖化アミンと糖化アミン酸化分解酵素とを反応させる前に、試料中に存在する糖酸化分解酵素の基質を除去することが好ましく、その手段としては、試料に前記糖酸化分解酵素を添加することが好ましい。

【0013】本発明の測定方法において、前記糖酸化分解酵素が、グルコースオキシダーゼ（以下、「GOD」という）、β-ガラクトシダーゼ、ピラノースオキシダーゼからなる群から選択された少なくとも一つの酸化酵素であることが好ましい。

【0014】また、糖化アミンが糖化タンパク質等の場合、グルコースにより糖化されていることが多いため、糖化アミンの酸化分解により生成される糖が、グルコンンであることが好ましく、この場合、前記糖酸化分解酵素は前記GODが特に好ましい。

【0015】本発明の測定方法において、前記糖を酸化分解するために、前記糖酸化分解酵素を反応溶液に、濃度1,000~5000,000U/リットルの範囲になるように添加することが好ましく、特に好ましくは、10,000~1000,000U/リットルの範囲である。

【0016】本発明の測定方法において、糖化アミン酸化分解酵素が、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（FAOD）であることが好ましい。

【0017】本発明の測定方法において、過酸化水素量の測定が、ペルオキシダーゼと前記ペルオキシダーゼにより酸化される基質とを用いた測定であることが好ましい。

【0018】前記酸化される基質は、酸化により発色する基質（以下、「発色性基質」という）であることが好ましい。前記発色性基質としては、N-（カルボキシメチルアミノカルボニル）-4,4'-ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミンナトリウム（例えば、DA-64：和光純薬社製等）等の高感度発色剤であることが好ましいが、これには特に制限されず、この他にも、例えば、オルトフェニレンジアミン（OPD）、トリンダー試薬とアミノアンチピリンとを組み合わせた発色性基質等が使用できる。

【0019】これらの本発明の測定方法において、測定対象物は、糖化アミンであれば特に制限されないが、前述のように糖化タンパク質、糖化ペプチドまたは糖化アミノ酸であることが好ましい。前記糖化タンパク質としては、例えば、HbA1c、糖化アルブミン、糖化グロブリン、糖化カゼイン等があげられる。また、血液中の糖化タンパク質を測定することは、糖尿病の診断に有用であることから、測定対象試料は、血液であることが好ましい。しかし、例えば、糖化タンパク質は、全血、血漿、血清、血球等および尿等の生体試料や、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食料等にも含まれるため、測定対象試料は、特に制限されない。

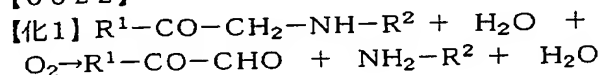
【0020】なお、本発明の測定方法は、例えば、測定

キットに適用することが好ましく、これにより、本発明の測定方法を簡便かつ迅速に行なうことができる。

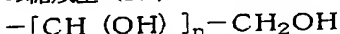
【0021】

【発明の実施の形態】本発明の測定方法において使用できるFAODとしては、下記式（化1）に示す反応を触媒するFAODであることが好ましい。

【0022】



【0023】前記式（化1）において、 $R^1$ は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基（糖残基）を意味する。前記糖残基（ $R^1$ ）は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アムドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基（ $R^1$ ）は、グルコース残基（アルドース残基）となる。この糖残基（ $R^1$ ）は、例えば、



で示すことができ、 $n$ は、0~6の整数である。

【0024】前記式（化1）において、 $R^2$ は、特に制限されないが、糖化アミンが糖化アミノ酸、糖化ペプチドまたは糖化タンパク質の場合、α-アミノ基が糖化されている場合と、それ以外のアミノ基が糖化されている場合とで異なる。

【0025】前記式（化1）において、α-アミノ基が糖化されている場合、 $R^2$ は、下記式（化2）で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。

【0026】



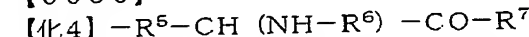
【0027】前記式（化2）において、 $R^3$ はアミノ酸側鎖基を示し、 $R^4$ は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式（化3）で示すことができる。下記式（化3）において、 $n$ は、0以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様に、アミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。

【0028】

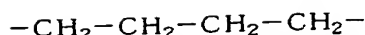


【0029】また、前記式（化1）において、α-アミノ基以外のアミノ基が糖化されている（アミノ酸側鎖基が糖化されている）場合、 $R^2$ は下記式（化4）で示すことができる。

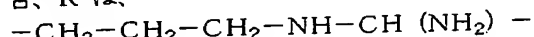
【0030】



【0031】前記式（化4）において、 $R^5$ は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、 $R^5$ は



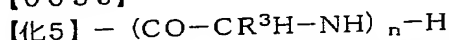
であり、例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、 $\text{R}^5$ は、



である。

【0032】また、前記式(化4)において、 $\text{R}^6$ は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(化5)で示すことができる。なお、下記式(化5)において、 $n$ は0以上の整数であり、 $\text{R}^3$ は、  
前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は 10  
全て同一でも、異なっているも良い。

【0033】



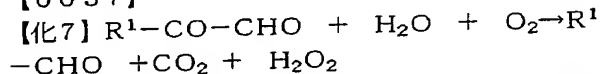
【0034】また、前記式(化4)において、 $\text{R}^7$ は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(化6)で示すことができる。なお、下記式(化6)において、 $n$ は0以上の整数であり、 $\text{R}^3$ は、  
前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は  
全て同一でも、異なっているも良い。

【0035】



【0036】本発明の測定方法において、前記糖酸化分解酵素が酸化分解する糖は、前記式(化1)において、 $\text{R}^1-\text{CO}-\text{CHO}$ で示される糖である。ただし、この場合、 $\text{R}^1$ は、糖残基を示し、水酸基は含まない。この糖と前記糖酸化分解酵素との反応は、下記式(化7)に示す反応であると推測される。下記式(化7)において、 $\text{R}^1$ は、前述のように糖残基であり、例えば、 $-\text{C}(\text{H}(\text{OH}))_n-\text{CH}_2\text{OH}$ で示すことができ、 $n$ は、0  
~6の整数である。

【0037】



【0038】つぎに、本発明の測定方法について、前記糖化アミン酸化分解酵素としてFAOD、糖酸化分解酵素としてGODをそれぞれ用いて、血球中の糖化タンパク質を測定する例をあげて説明する。

【0039】まず、全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離し、これを溶血する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、界面活性剤を用いる方法が好ましい。

【0040】前記界面活性剤としては、例えば、Triton X-100、Tween-20、Brij 35等が使用できる。前記界面活性剤による処理条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が、1~10体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が0.1~1重量%になるように前記界面活性剤を添加し、室温で、5秒~1分程度攪拌すればよい。

【0041】つぎに、前記溶血試料に対し、プロテアーゼ処理を行う。前記プロテアーゼの種類は、特に制限されず、例えば、プロテアーゼK、ズブチリシン、トリプシン、アミノペプチダーゼ、パンシニン等が使用でき、この他にも、例えば、糖化アミノ酸遊離酵素等が使用できる。前記プロテアーゼ処理は、通常、緩衝液中で行われ、その処理条件は、使用するプロテアーゼの種類、糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

【0042】プロテアーゼとしてトリプシンを用いて、前記溶血試料を処理する場合、通常、反応液中のプロテアーゼ濃度100~6,000U/リットル、反応液中の血球濃度0.2~5体積%、反応温度20~50℃、反応時間10分~20時間、pH6~9の範囲である。また、前記緩衝液の種類も特に制限されず、例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、EPPS緩衝液、PIPES緩衝液等が使用できる。

【0043】つぎに、前記プロテアーゼ処理により得られた分解物を、FAODで処理する。このFAOD処理により、前記式(化1)に示す反応が触媒される。

【0044】このFAOD処理は、前記プロテアーゼ処理と同様に緩衝液中で行うことが好ましく、前記緩衝液としては、特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。

【0045】つぎに、前記FAOD処理物を、GODで処理する。これにより、前記FAOD処理で過酸化水素と共に生成された糖を酸化分解し、さらに過酸化水素を生成させる。前記FAOD処理とこのGOD処理とにより、理論的には1モルの糖化アミノ酸残基から2モルの過酸化水素が生成されることになる。

【0046】このGOD処理は、前述のように、GODを反応溶液に、濃度1,000~5000,000U/リットルの範囲になるように添加することが好ましく、反応条件は、通常、温度15~37℃の範囲、反応時間1~30分の範囲である。また、前記プロテアーゼ処理や前記FAOD処理等と同様に緩衝液中で行うことが好ましい。前記緩衝液としては、例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、EPPS緩衝液、PIPES緩衝液、クエン酸緩衝液等の緩衝液が使用できるが、操作の簡便性等の点から、前記プロテアーゼ処理や前記FAOD処理と同じ緩衝液を使用することが好ましい。

【0047】そして、前記FAOD処理で生成した過酸化水素と、前記GOD処理で生成した過酸化水素とを、PODおよび前記PODの発色性基質を用いた酸化還元反応を利用して測定する。

【0048】前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、過酸化水素濃度等により適宜決定される。また、前記緩衝液は、特に制限されず、前記FAOD処理およびGOD処理等と同様の緩衝液等が使用できる。

【0049】なお、前記過酸化水素量は、前記ペルオキシダーゼ等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法により測定することもできる。

【0050】前記発色性基質を用いた場合は、その発色（反応液の吸光度）を分光光度計で測定することにより、過酸化水素の濃度を測定でき、これから試料中の糖化タンパク質濃度を知ることができる。このように、本発明の測定方法によれば、測定対象物を高精度で測定できる。

【0051】この測定において、各処理工程は、前述の10ように別々に行ってもよいが、例えば、以下に示すような組み合わせで同時に行ってもよい処理工程がある。

- 1：溶血処理+プロテアーゼ処理
- 2：プロテアーゼ処理+FAOD処理
- 3：FAOD処理+GOD処理
- 4：FAOD処理+GOD処理+POD酸化還元処理
- 5：プロテアーゼ処理+FAOD処理+GOD処理+POD酸化還元処理

【0052】また、前記FAODと、GODと、PODおよび発色性基質の添加順序も、特に制限されない。

【0053】また、試料中にGODとの反応により過酸化水素を生成する物質（GOD基質）が存在する場合は、前記FAOD処理等を行う前に、試料（例えば、血球の場合は溶血試料）の前処理として、予め前記試料にGODを添加して、前記GOD基質を消去させてもよい。また、この前処理において十分量のGODを試料に添加すれば、後で行うFAOD処理物に対するGOD処理において、再度GODを添加しなくてもよい。この場合は、GODを反応液に、濃度1,000~5,000, 3000U/リットルの範囲になるように添加することが好ましい。

【0054】前記試料の前処理によって生じた過酸化水素は、例えば、溶血試料中に最初から存在するカタラーゼにより消去させてもよいし、別途カタラーゼを添加し

（酸化還元反応液Aの組成）

DA64（和光純薬社製）

POD（Type III：東洋紡社製）

FAOD（旭化成社製）

緩衝液

【0059】（GOD溶液）GOD（東洋紡社製）を2,000KU/リットルの濃度になるように精製水に溶解した。

【0060】（実施例2および比較例2）前記実施例1で使用した前記酸化還元反応液Aにおいて、前記リン酸緩衝液の代わりに、100mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.0）を使用した以外は、実施例1と同様にして吸光度の測定を行った。また、前記GOD溶液の代わりに水を、前記リン酸緩衝液の代わりに前記トリス塩酸緩衝液

FV終濃度  
（ $\mu\text{mol}/\text{リットル}$ ）

て消去させてもよい。なお、前記試料の前処理を行い、かつ前処理によって生成した過酸化水素を前記カタラーゼにより消去した場合、このカタラーゼによって、後に行うFAOD処理およびGOD処理で生成する過酸化水素が消去されることを防ぐために、FAODの添加と共に、過剰量のPODおよび発色性基質を添加することが好ましい。この場合、PODは、前記カタラーゼの添加量（U）に対し、5~100倍の活性（U）量を添加することが好ましい。

【0055】

【実施例】（実施例1および比較例1）各濃度のフルクトシルバリン（以下、「FV」という）溶液10 $\mu\text{l}$ に、下記GOD溶液40 $\mu\text{l}$ をそれぞれ添加した。そして、これらの溶液に、下記酸化還元反応液A 50 $\mu\text{l}$ をそれぞれ添加して酸化還元反応を開始し、各反応液の主波長694nm、副波長884nmにおける吸光度を、生化学自動分析装置JCA-BM8（日本電子社製）を用いて測定した。また、前記GOD溶液の代わりに水（D.W）を用いた以外は、前述の方法と同様にして吸光度の測定を行ったものを比較例1とした。これらの結果を、表1および図1のグラフに示す。同図は、FVの終濃度と吸光度との関係を示すグラフであり、同図において●はGOD処理したもの（実施例1）、はGOD未処理（D.W添加）のもの（比較例1）を示す。

【0056】（FV溶液）バリン（ペプチド研究所社製）とグルコースとを用いて、定法によりFVを調製した。そして、前記FVを、所定の濃度（62, 5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{mol}/\text{リットル}$ ）になるように蒸留水に添加した。

【0057】（緩衝液）100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液と、100mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 溶液とを混合して、100mMリン酸緩衝液（pH8.0）を調製した。

【0058】

40 $\mu\text{mol}/\text{リットル}$

200KU/リットル

10KU/リットル

100mmol/リットル

40をそれぞれ用いた以外は、実施例1と同様にして測定を行ったものを比較例2とした。これらの結果を、表2および図2のグラフに示す。同図は、FVの終濃度と吸光度との関係を示すグラフであり、同図において●はGOD処理したもの（実施例2）、はGOD未処理（D.W添加）のもの（比較例2）を示す。

【0061】

【表1】

| 実施例1   | 比較例1   |
|--------|--------|
| (Abs.) | (Abs.) |

0  
0.625  
1.25  
2.5  
5.0  
10.0

0  
0.045  
0.098  
0.208  
0.444  
0.950

0  
0.038  
0.076  
0.151  
0.304  
0.623

【0062】

| FV終濃度<br>( $\mu\text{mol}/\text{リットル}$ ) | 実施例1<br>(Abs.) | 比較例1<br>(Abs.) |
|--|----------------|----------------|
| 0  | 0              | 0              |
| 0.625                                    | 0.021          | 0.010          |
| 1.25                                     | 0.078          | 0.047          |
| 2.5                                      | 0.204          | 0.126          |
| 5.0                                      | 0.476          | 0.292          |
| 10.0                                     | 1.097          | 0.662          |

【0063】前記表1、2および図1、2に示すように、実施例では、GOD処理を行ったことにより、生成された過酸化水素量を示す吸光度が比較例に比べて増加した。また、その検出感度は、比較例に対して、実施例1では約1.5倍、実施例2では約1.7倍であった。この結果より、本発明の測定方法によれば、測定精度を向上できることがわかる。

【0064】

【発明の効果】以上のように、本発明の測定方法によれば、試料中の糖化アミンを、簡便かつ高精度で測定できる。このため、本発明の測定方法を、例えば、赤血球中

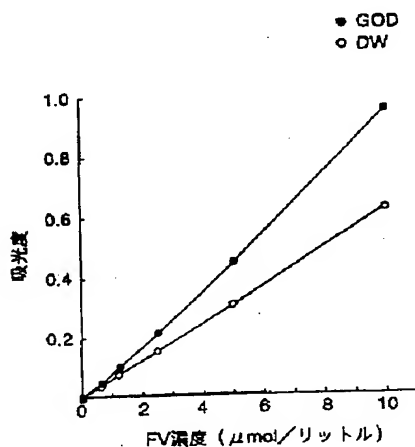
のHbA1cの測定の際に適用すれば、従来よりも測定精度が向上し、HbA1cの糖尿病診断等の指標物質としての重要性がさらに向上する。

【図面の簡単な説明】

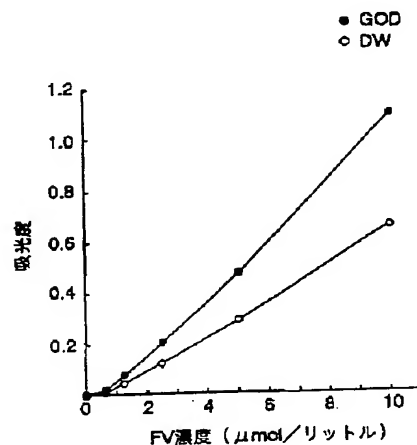
20 【図1】本発明の測定方法の一実施例において、試料中のFV濃度と吸光度との相関関係を示したグラフである。

【図2】本発明の測定方法のその他の実施例において、試料中のFV濃度と吸光度との相関関係を示したグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>  
G 01 N 33/72

識別記号

F I  
G 01 N 33/72

シーコード (参考)

A